

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局
特許協力条約に基づいて公開された国際出願



(51) 国際特許分類6 C12P 7/64	A1	(11) 国際公開番号 WO98/18952
		(43) 国際公開日 1998年5月7日(07.05.98)
(21) 国際出願番号 PCT/JP97/03949		(81) 指定国 CA, JP, KR, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
(22) 国際出願日 1997年10月30日(30.10.97)		添付公開書類 国際調査報告書
(30) 優先権データ 特願平8/304104 1996年10月30日(30.10.96) JP		
(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 日本水産株式会社(NIPPON SUISAN KAISHA, LTD.)(JP/JP) 〒100 東京都千代田区大手町二丁目6番2号 Tokyo, (JP)		
(72) 発明者 ; および		
(75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 沖田裕司(OKITA, Yuji)(JP/JP) 今井由紀枝(IMAI, Yukie)(JP/JP) 清水延寿(SHIMIZU, Nobuyoshi)(JP/JP) 〒192 東京都八王子市北野町559-6 日本水産株式会社 中央研究所内 Tokyo, (JP)		
(74) 代理人 弁理士 須藤阿佐子(SUDOU, Asako) 〒184 東京都小金井市梶野町5-6-3-103 Tokyo, (JP)		

(54)Title: PROCESS FOR PRODUCING FATS CONTAINING HIGHLY UNSATURATED FATTY ACIDS CONTAINING SELECTIVELY CONCENTRATED DOCOSAHEXAENOIC ACID

(54)発明の名称 選択的にドコサヘキサエン酸が濃縮された高度不飽和脂肪酸含有油脂を製造する方法

(57) Abstract

A process for producing fats containing highly unsaturated fatty acids containing selectively concentrated docosahexaenoic acid by hydrolyzing fats containing highly unsaturated fatty acids with lipases having an elevated capability of selectively concentrating docosahexaenoic acid. These lipases are at least two lipases including monoglyceride lipase and/or diglyceride lipase originating in microorganisms belonging to the genera *Penicillium* and *Candida*, *Penicillium* and *Mucor*, or *Penicillium* and *Rhizopus*. This process makes it possible to produce fats containing highly unsaturated fatty acids with an elevated ratio of DHA to EPA.

(57) 要約

高度不飽和脂肪酸含有油脂を、ドコサヘキサエン酸の選択的濃縮能を高めたリパーゼ群により加水分解反応を行うことによって、選択的にドコサヘキサエン酸が濃縮された高度不飽和脂肪酸含有油脂を製造する方法。リパーゼ群は、モノグリセライドリパーゼおよび/またはジグリセライドリパーゼを含む2種以上のリパーゼである。モノグリセライドリパーゼおよび/またはジグリセライドリパーゼを含む2種以上のリパーゼは、ペニシリウム属およびキャンディダ属、またはペニシリウム属およびムコール属、またはペニシリウム属およびリゾープス属微生物由来である。

EPAに対するDHAの比率を上昇した高度不飽和脂肪酸含有油脂を製造することができる。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AL	アルバニア	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SN	セネガル
AM	アルメニア	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
AT	オーストリア	GA	ガボン	LV	ラトヴィア	TD	チヨード
AU	オーストラリア	GB	英国	MC	モナコ	TG	チヨゴー
AZ	アゼルバイジャン	GE	グルジア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GH	ガーナ	MG	マダガスカル	TM	トルコメニスタン
BB	バルバドス	GM	ガンビア	MK	マケドニア旧ユーゴス	TT	トリニダッド・トバゴ
BE	ベルギー	GN	ギニア	ML	ラヴィア共和国	UA	ウクライナ
BF	ブルキナ・ファソ	GW	ギニア・ビサオ	MN	モンゴル	UG	ウガンダ
BG	ブルガリア	GR	ギリシャ	MR	モーリタニア	U	米国
BJ	ベナン	HU	ハンガリー	MW	マラウイ	UZ	ウズベキスタン
BR	ブラジル	ID	インドネシア	MX	メキシコ	VN	ヴィエトナム
BY	ベラルーシ	IE	アイルランド	NE	ニジエール	YU	ヨーロッパ・ラヴィア
CA	カナダ	IL	イスラエル	NL	オランダ	ZW	ジンバブエ
CF	中央アフリカ	IS	アイスランド	NO	ノールウェー		
CG	コンゴ共和国	IT	イタリア	NZ	ニュージーランド		
CH	スイス	JP	日本	PL	ポーランド		
CI	コートジボアール	KE	ケニア	PT	ポルトガル		
CM	カメルーン	KG	キルギス	RO	ルーマニア		
CN	中国	KP	北朝鮮	RU	ロシア		
CU	キューバ	KR	韓国	SD	スードン		
CY	キプロス	KZ	カザフスタン	SE	スウェーデン		
CZ	チェコ	LC	セント・ルシア	SG	シンガポール		
DE	ドイツ	LI	リヒテンシャウタイン	SI	スロヴェニア		
DK	デンマーク	LK	スリランカ	SK	スロ伐キア		
EE	エストニア	LR	リベリア	SL	シエラ・レオネ		
ES	スペイン	LS	レント				

明細書

選択的にドコサヘキサエン酸が濃縮された高度不飽和脂肪酸含有油脂を製造する方法

5

技術分野

本発明は、選択的にドコサヘキサエン酸が濃縮された高度不飽和脂肪酸含有油脂の製造方法に関する。

本発明において、高度不飽和脂肪酸（以下「P U F A」と略すこともある。）は、エイコサベンタエン酸（以下、「E P A」と略称する。）やドコサヘキサエン酸（以下、「D H A」と略称する。）などの1分子当たり18個以上の炭素原子と3個以上の二重結合を有する脂肪酸を意味する。

15 背景技術

魚油には種々の生理作用を有するE P AやD H AなどのP U F Aが豊富に含まれていることが知られている。魚油の構成脂肪酸中にはP U F Aが約10～40%くらい含まれている。しかし、これらP U F Aはその構造上熱などに弱く、酸化を受けやすいという性質を持っている。リバーゼなどの酵素は常温常圧で作用することから、魚油をはじめとするP U F Aを多く含有する油脂の改質に特に有効であると考えられる。既に、P U F Aに対して作用性の低いリバーゼを用いてP U F Aを濃縮する方法については多数の報告例があり、例えば魚油をCandida cylindracea由来のリバーゼで加水分解する方法（特公平4-16519）などが知られている。

また近年、E P Aが乳幼児の成長に必須なアラキドン酸と拮抗して成

長を抑制するなどの現象が知られるようになり、P U F Aの中でも特にD H Aのみを選択的に濃縮する能力を持ったリバーゼの重要性が高まっている。このようなリバーゼとしてはキャンディダ・ルゴーサ (C. rugosa) 由来のリバーゼの報告などがある（特開平3-10694）。

5

しかし、このように一種類のリバーゼのみを使用した場合、生成する油脂はそのリバーゼの有する性質に支配されてしまう。例えば、これらのリバーゼは、P U F Aに対する作用性が低いものの全く作用しないわけではないため、P U F Aの回収率の点で満足できるものではなかった。

10 また、単一のリバーゼによる方法では加水分解反応は平衡状態に達してしまい、P U F Aの濃縮もそれ以上進行しないという問題もあった。

発明の開示

本発明はE P Aに対するD H Aの比率を上昇した高度不飽和脂肪酸含有油脂を製造することを目的とする。

本発明者らは上記課題に関して、選択的濃縮能と高回収率を両立したリバーゼの検索から開始し、様々な生物種から取得された複数種のリバーゼを組み合わせて基質に作用させる実験を通して、単一のリバーゼでは達成できなかった反応系のD H A選択的濃縮能の上昇が、特定の組み合わせのリバーゼ群を利用することによって達成できることを見いだし、本発明を完成した。

本発明は、高度不飽和脂肪酸含有油脂を、ドコサヘキサエン酸の選択的濃縮能を高めたリバーゼ群により加水分解反応を行うことによって、選択的にドコサヘキサエン酸が濃縮された高度不飽和脂肪酸含有油脂を製造する方法である。

魚油の構成脂肪酸中の P U F A とグリセリンとのエステル結合をほとんど加水分解しないかもしくはわずかしか加水分解しない性質のリバーゼによる加水分解により、魚油の構成脂肪酸中の P U F A 以外の脂肪酸 5 とグリセリンとのエステル結合は容易に加水分解され P U F A はグリセライド部に濃縮される。そのリバーゼによる加水分解反応系に、さらにトリグリセライドには作用せずジグリセライドとモノグリセライドに作用して加水分解反応を行うリバーゼを添加して加水分解反応を行うと、グリセライド部に濃縮された P U F A について、D H A よりも E P A の 10 方を加水分解し、結果として、E P A よりも D H A の方が一層グリセライド部に濃縮される。上記リバーゼが持つ本来の性質、すなわち魚油の構成脂肪酸中の P U F A とグリセリンとのエステル結合をほとんど加水分解しないかもしくはわずかしか加水分解しない性質は、ほとんど影響を受けない。その系では、さらに添加したリバーゼが D H A よりも E P 15 A の方が優先して加水分解するという新しい性質を発揮する。

ドコサヘキサエン酸の選択的濃縮能を高めたリバーゼ群は、モノグリセライドリバーゼおよび／またはジグリセライドリバーゼの 1 種以上およびそれ以外のリバーゼ 1 種以上を含む 2 種以上のリバーゼである。こ 20 こで、モノグリセライドリバーゼおよび／またはジグリセライドリバーゼとは、トリグリセライドには作用せず、ジグリセライドとモノグリセライドに作用して加水分解反応を行うリバーゼを意味する。

リバーゼによる加水分解系に、さらにモノグリセライドリバーゼおよび／またはジグリセライドリバーゼを添加して加水分解反応を行うこと 25 によって、反応系の D H A 選択的濃縮能が上昇する。

本発明は、高度不飽和脂肪酸含有油脂を、モノグリセライドリバーゼ

および／またはジグリセライドリバーゼの1種以上およびそれ以外のリバーゼ1種以上を含む2種以上のリバーゼにより加水分解反応を行うことによって、選択的にドコサヘキサエン酸が濃縮された高度不飽和脂肪酸含有油脂を製造する方法である。

5

上記モノグリセライドリバーゼおよび／またはジグリセライドリバーゼは、好ましくはペニシリウム属 (Penicillium) 微生物由来である。

本発明は、高度不飽和脂肪酸含有油脂を、ペニシリウム属 (Penicillium) 微生物由来のモノグリセライドリバーゼおよび／またはジグリセライドリバーゼの1種以上およびそれ以外のリバーゼ1種以上を含む2種以上のリバーゼにより加水分解反応を行うことによって、選択的にドコサヘキサエン酸が濃縮された高度不飽和脂肪酸含有油脂を製造する方法である。

15

上記ペニシリウム属微生物が、ペニシリウム カマンベルティ (Penicillium camembertii) である。

本発明は、高度不飽和脂肪酸含有油脂を、ペニシリウム カマンベルティ (Penicillium camembertii) 由来のモノグリセライドリバーゼおよび／またはジグリセライドリバーゼの1種以上およびそれ以外のリバーゼ1種以上を含む2種以上のリバーゼにより加水分解反応を行うことによって、選択的にドコサヘキサエン酸が濃縮された高度不飽和脂肪酸含有油脂を製造する方法である。

25

上記リバーゼ群のうち、モノグリセライドリバーゼおよび／またはジグリセライドリバーゼ以外のリバーゼは、公知のキャンディダ属 (Candida)、ムコール属 (Mucor)、リゾーブス属 (Rhizopus)、アスペ

ルギルス属 (Aspergillus)、シュードモナス属 (Pseudomonas)、アルカリゲネス属 (Alcaligenes)、ペニシリウム属 (Penicillium)、アクロモバクター属 (Achromobacter)、ジオトリカム属 (Geotrichum)、フザリウム属 (Fusarium)、フミクラ属 (Humicula)、セラチア属 (Serratia)、クロモバクテリウム属 (Chromobacterium) および／またはスタフィロコッカス属 (Staphylococcus) 微生物由来のリバーゼのいずれかからなる。これらの微生物は、「“Enzymes in Food Processing” Third Edition p. 206～208, ACADEMIC PRESS, INC., Harcourt Brace & Company」に記載された公知微生物である。

10 本発明は、高度不飽和脂肪酸含有油脂を、ペニシリウム属 (Penicillium) 微生物由来のモノグリセライドリバーゼおよび／またはジグリセライドリバーゼの 1 種以上、ならびに、上記列記した属に属する微生物由来のリバーゼ 1 種以上により加水分解反応を行うことによって、選択的にドコサヘキサエン酸が濃縮された高度不飽和脂肪酸含有油脂を製造する方法である。

上記モノグリセライドリバーゼおよび／またはジグリセライドリバーゼの 1 種以上およびそれ以外のリバーゼ 1 種以上を含む 2 種以上のリバーゼの組み合わせが、ペニシリウム属とキャンディダ属、またはペニシリウム属とムコール属、またはペニシリウム属とリゾープス属である。

20 本発明は、高度不飽和脂肪酸含有油脂を、ペニシリウム属およびキャンディダ属、またはペニシリウム属およびムコール属、またはペニシリウム属およびリゾープス属微生物由来のモノグリセライドリバーゼおよび／またはジグリセライドリバーゼの 1 種以上およびそれ以外のリバーゼ 1 種以上を含む 2 種以上のリバーゼにより加水分解反応を行うことによって、選択的にドコサヘキサエン酸が濃縮された高度不飽和脂肪酸含

有油脂を製造する方法である。

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明に用いる油脂は、アラキドン酸 (C₂₀:4ω6)、EPA (C₂₀:5ω3)、DHA (C₂₂:6ω3)などのPUFAを含有するものならどのようなものでも良い。これらPUFAを含有する油脂はイワシ、マグロなどの魚類や甲殻類などの海産動物、ある種の微生物が产生することが知られている。例えば、マグロ油ではパルミチン酸14.6%、オレイン酸17.2%に対して、DHAは22.0%と大量に含まれていることが知られている。

本発明で使用するモノグリセライドリバーゼおよび／またはジグリセライドリバーゼは、トリグリセライドにはほとんどあるいは全く作用せず、モノグリセライドおよび／またはジグリセライドに作用するものであればどのようなものでも良く、ペニシリウム属 (Penicillium) 微生物由來のものが例示される。これらのリバーゼは、いずれも市販されているものである。

例えば、ペニシリウム属微生物としては、ペニシリウム カマンベルティ (Penicillium camembertii) が好ましい例として例示される。市販されていて容易に入手可能なペニシリウム カマンベルティ由来のリバーゼ [商品名: リバーゼG、大野製薬(株)] を利用することもできる。

本発明において用いられる、上記のモノグリセライドリバーゼおよび／またはジグリセライドリバーゼの1種以上と組み合わせて利用するリバーゼとしては、キャンディダ属 (Candida)、ムコール属 (Mucor)、

リゾーブス属 (Rhizopus)、アスペルギルス属 (Aspergillus)、シュードモナス属 (Pseudomonas)、アルカリゲネス属 (Alcaligenes)、ペニシリウム属 (Penicillium)、アクロモバクター属 (Achromobacter)、ジオトリカム属 (Geotrichum)、フザリウム属 (Fusarium)、フミクラ属 (Humicula)、セラチア属 (Serratia)、クロモバクテリウム属 (Chromobacterium)、スタフィロコッカス属 (Staphylococcus) 微生物由来のリバーゼ等が挙げられる。これら周知リバーゼの中から、目的に応じて適宜選択することができる。例えば P U F A の濃縮を目的とする場合は、市販酵素ではキャンディダ シリンドラシエ由来のリバーゼ

10 [商品名：リバーゼ O F、名糖産業（株）] や、ムコール ミーハイ (Mucor miehei) 由来のリバーゼ（商品名：リポザイム、ノボ・ノルディスク社）などが利用できる。これらのリバーゼは必要に応じて固定化したものを使用することもできる。

15 本発明に使用する上記モノグリセライドリバーゼおよび／またはジグリセライドリバーゼの 1 種以上およびそれ以外のリバーゼ 1 種以上を含む 2 種以上のリバーゼとしては、例えば、ペニシリウム属およびキャンディダ属、またはペニシリウム属およびムコール属、またはペニシリウム属およびリゾーブス属微生物由来のものを組み合わせて用いることができる。

20 これら 2 種以上のリバーゼは反応の開始時から全種類添加してもよく、あるいは経時的に 1 種類あるいは数種類づつ添加してもよい。リバーゼの添加量は上記目的が達せられる量ならどのような量でもよいが、油脂 1 g に対してたとえば 0.1 ~ 1 0 0 0 0 ユニット、通常 1 ~ 2 0 0 0 ユニット程度使用する。

本発明における加水分解反応は十分な量の水または緩衝液の存在下で行う必要があり、たとえば魚油に対して1～1000%（重量%）、望ましくは10～100%程度使用する。加水分解反応は使用するリバーゼが失活しない温度において、静置あるいは攪拌することによって
5 進行する。

上記特定の2種以上のリバーゼを用いて油脂を加水分解し、加水分解反応によって生じたグリセリンや脂肪酸は公知の方法、例えばアルカリ脱酸、水蒸気蒸留、溶剤抽出、イオン交換樹脂などの方法で除去する
10 ことができる。このようにして上記加水分解油より上記グリセライド部を分取し、上記の目的を達成した油脂を得ることができる。

なお、加水分解反応の進行は反応混合物の酸価を測定することによって把握することができる。すなわち、加水分解率は次式〔1〕：

$$\text{加水分解率} (\%) = (\text{酸価} / \text{原料油のケン化価}) \times 100 \quad [1]$$

15 また、各脂肪酸の回収率は原料油中の該当脂肪酸量とリバーゼ処理油中の該当脂肪酸量の比から求められる。例えばDHA回収率は、原料油中のDHA量とリバーゼ処理油中のDHA量の比から求められる。すなわち、次式〔2〕：

$$20 \quad \text{DHA回収率} (\%) = \frac{\text{リバーゼ処理油中DHA} (\%) \times \{100 - \text{加水分解率} (\%)\}}{\text{原料油中DHA} (\%)} \quad [2]$$

によって算出できる。

発明を実施するための最良の形態

25 以下、本発明を実施例によりさらに詳細に説明するが、これらの実施例によって本発明はなんら限定されるものではない。

実施例 1

マグロ油 (DHA 21. 97%、EPA 7. 60%、DHA/EPA 2. 89、ケン化価 185) 2ml、蒸留水 2ml にムコール ミーハイ由来リバーゼ (商品名: リポザイム、ノボ・ノルディスク社) 400 ユニット、ペニシリウム カマンベルティ由来リバーゼ (商品名: リバーゼ G、天野製薬 (株)) 80 ユニットを加え、35°Cで16時間攪拌した。

加水分解率は 43. 4% だった。加水分解物を脱酸、脱水して得られたグリセライド画分は DHA 35. 72%, EPA 7. 27%, DHA/EPA 4. 92 で、EPA に対して DHA が選択的に濃縮された。この時の DHA 回収率は 92. 06% と高い値を示した。

実施例 2

実施例 1 と同一の条件で再度試験を行った。加水分解率は 46. 6% で、得られたグリセライド画分は DHA 37. 14%, EPA 7. 01%, DHA/EPA 5. 30 で、EPA に対して DHA が選択的に濃縮された。この時の DHA 回収率は 90. 23% と高い値を示した。

実施例 3

実施例 1 と同じマグロ油 300ml、蒸留水 300ml にムコール ミーハイ由来リバーゼ 60, 000 ユニット、ペニシリウム カマンベルティ由来リバーゼ 12, 000 ユニットを加え、35°Cで16時間攪拌した (800 rpm)。

加水分解率は 50. 6% だった。加水分解物を脱酸、脱水して得られたグリセライド画分は DHA 39. 58%, EPA 7. 48%, DHA

／EPA5.29で、EPAに対してDHAが選択的に濃縮された。この時のDHA回収率は88.94%と高い値を示した。

比較例1

5 実施例1と同じマグロ油2ml、蒸留水2mlにムコール ミーハイ由来リバーゼ400ユニットを加え、ペニシリウム カマンベルティ由来リバーゼは加えずに35℃で16時間攪拌した。加水分解率は25.1%で、実施例1と比較して加水分解反応はあまり進行しなかった。加水分解物を脱酸、脱水して得られたグリセライド画分はDHA回収率について97.17%と高い値を示したものの、濃縮能力についてはDHA 28.52%, EPA 7.74%, DHA/EPA 3.69という結果で、DHAはあまり濃縮されなかった。

比較例2

15 実施例1と同じマグロ油2ml、蒸留水2mlにペニシリウム カマンベルティ由来リバーゼ80ユニットを加え、ムコール ミーハイ由来リバーゼは加えずに35℃で16時間攪拌した。加水分解率は0.2%で、加水分解反応はほとんど進行しなかった。加水分解物を脱酸、脱水して得られたグリセライド画分はDHA 22.18%, EPA 7.35%, DHA/EPA 3.02で、DHAはほとんど濃縮されず、原料のマグロ油とほとんど変わらない値を示した。

25 このように、モノグリセライドリバーゼおよび／またはジグリセライドリバーゼの1種以上およびそれ以外のリバーゼ1種以上を含む2種以上のリバーゼは、それぞれ単独で使用してもほとんど効果を発揮することができないことが分かる。

しかしこれらのリバーゼを併用することによって、リボザイムが有するDHAに対する高い回収能をあまり低下させることなくDHAの濃縮率を高め、かつEPAに対するDHAの比率を上昇させることが出来る。

5 実施例4

実施例1と同じマグロ油2ml、蒸留水2mlにキャンディダ・シリンドラシェ由来リバーゼ〔商品名：リバーゼOF、名糖産業（株）〕200ユニット、ペニシリウム・カマンベルティ由来リバーゼ40ユニットを加え、35℃で16時間攪拌した。加水分解率は52.6%だった。
10 加水分解物を脱酸、脱水して得られたグリセライド画分はDHA40.86%，EPA8.84%，DHA/EPA4.62で、EPAに対してDHAが選択的に濃縮された。

実施例5

15 実施例1と同じマグロ油2ml、蒸留水2mlにキャンディダ・シリンドラシェ由来リバーゼ1600ユニット、ペニシリウム・カマンベルティ由来リバーゼ400ユニットを加え、35℃で20時間攪拌した。加水分解率は74.0%だった。加水分解物を脱酸、脱水して得られたグリセライド画分はDHA48.10%，EPA5.50%，DHA/EPA8.75で、EPAに対してDHAが選択的に濃縮された。

比較例3

実施例1と同じマグロ油2ml、蒸留水2mlにキャンディダ・シリンドラシェ由来リバーゼ200ユニットを加え、ペニシリウム・カマンベルティ由来リバーゼは加えずに35℃で16時間攪拌した。加水分解率は34.1%で、実施例4と比較すると加水分解反応は進行していな

かった。加水分解物を脱酸、脱水して得られたグリセライド画分は D H A 31. 82%, E P A 9. 08%, D H A / E P A 3. 51 で、 D H A は濃縮されたものの実施例 4 と比較すると低い値を示し、かつ E P A に対する D H A の選択的濃縮性も低かった。

5

比較例 4

実施例 1 と同じマグロ油 2 m l 、蒸留水 2 m l に キャンディダ シリンドラシェ由来リバーゼ 1600 ユニットを加え、ペニシリウム カマンベルティ由来リバーゼは加えずに 35 °C で 20 時間攪拌した。加水分解率は 62. 7 % で、実施例 5 と比較すると加水分解反応は進行していなかった。加水分解物を脱酸、脱水して得られたグリセライド画分は D H A 44. 74%, E P A 5. 78%, D H A / E P A 7. 78 で、 D H A は濃縮されたものの実施例 5 と比較すると低い値を示し、かつ E P A に対する D H A の選択的濃縮性も低かった。

15

このように、モノグリセライドリバーゼおよび／またはジグリセライドリバーゼと組み合わせるリバーゼをムコール ミーハイ由来リバーゼから他のリバーゼに変更しても、これら 2 種以上のリバーゼを同時に加水分解反応に使用してはじめてその効果を発揮することが分かる。

20

実施例 6

実施例 1 と同じマグロ油 2 m l 、蒸留水 2 m l に リゾーブス オリゼー (Rhizopus oryzae) 由来リバーゼ (商品名: リバーゼ F - A P 15 、天野製薬) 400 ユニット、ペニシリウム カマンベルティ由来リバーゼ 80 ユニットを加え、 35 °C で 16 時間攪拌した。加水分解率は 51. 8 % だった。加水分解物を脱酸、脱水して得られたグリセライド画分は

D H A 4 1. 1 3 %、E P A 7. 0 2 %、D H A / E P A 5. 8 6 で、
E P A に対して D H A が選択的に濃縮された。

比較例 5

5 実施例 1 と同じマグロ油 2 m l、蒸留水 2 m l にリゾープス オリゼー由来リバーゼ 4 0 0 ユニットを加え、ペニシリウム カマンベルティ由来リバーゼは加えずに 3 5 °C で 1 6 時間攪拌した。加水分解率は 3 2. 7 % で、実施例 6 と比較すると加水分解反応は進行していなかった。加水分解物を脱酸、脱水して得られたグリセライド画分は D H A 3 2. 0
10 8 %、E P A 7. 0 5 %、D H A / E P A 4. 5 5 で、D H A は濃縮されたものの実施例 6 と比較すると低い値を示し、かつ E P A に対する D H A の選択的濃縮性も低かった。

実施例 7

15 実施例 6 で得られた D H A 濃縮油について、さらにリバーゼ反応を繰り返した。すなわち、実施例 6 で得られたグリセライド画分 2 m l、蒸留水 2 m l にリゾープス オリゼー由来リバーゼ 4 0 0 ユニット、ペニシリウム カマンベルティ由来リバーゼ 8 0 ユニットを加え、3 5 °C で 1 6 時間攪拌した。加水分解率は 3 5. 6 % だった。加水分解物を脱酸、脱水して得られたグリセライド画分は D H A 5 2. 3 6 %、E P A 5. 8 1 %、D H A / E P A 9. 0 1 だった。実施例 6 と比較して、E P A に対する D H A の選択的濃縮性がさらに向上した。

25 このように、キャンディダ シリンドラシエ由来リバーゼと比較してはるかに D H A 選択的濃縮性の低いリバーゼを用いても、モノグリセライドリバーゼおよび／またはジグリセライドリバーゼと組み合わせること

とによって飛躍的にDHAの選択的濃縮性が向上し、DHAを50%以上含有する油脂を実用的に製造することが可能であることが分かる。

産業上の利用可能性

5 EPAに対するDHAの比率を上昇した高度不飽和脂肪酸含有油脂を製造することができる。

10

15

20

25

請求の範囲

1. 高度不飽和脂肪酸含有油脂を、ドコサヘキサエン酸の選択的濃縮能を高めたりパーゼ群により加水分解反応を行うことによって、選択的にドコサヘキサエン酸が濃縮された高度不飽和脂肪酸含有油脂を製造する方法。
5
2. 上記リパーゼ群が、モノグリセライドリパーゼおよび／またはジグリセライドリパーゼの1種以上およびそれ以外のリパーゼ1種以上を含む2種以上のリパーゼである請求項1の選択的にドコサヘキサエン酸が濃縮された高度不飽和脂肪酸含有油脂を製造する方法。
10
3. 上記モノグリセライドリパーゼおよび／またはジグリセライドリパーゼが、ペニシリウム属 (Penicillium) 微生物由来である請求項2の選択的にドコサヘキサエン酸が濃縮された高度不飽和脂肪酸含有油脂を製造する方法。
15
4. 上記ペニシリウム属微生物が、ペニシリウム カマンベルティ (Penicillium camembertii) である請求項3の選択的にドコサヘキサエン酸が濃縮された高度不飽和脂肪酸含有油脂を製造する方法。
5.
5. 上記リパーゼ群のうち、モノグリセライドリパーゼおよび／またはジグリセライドリパーゼ以外のリパーゼが、キャンディダ属 (
20 Candida)、ムコール属 (Mucor)、リゾーブス属 (Rhizopus)、アスペルギルス属 (Aspergillus)、シュードモナス属 (Pseudomonas)、アルカリゲネス属 (Alcaligenes)、ペニシリウム属 (Penicillium)、アクロモバクター属 (Achromobacter)、ジオトリカム属 (Geotrichum)、フザリウム属 (Fusarium)、フミクラ属 (Humicula)、セラチア属 (
25 Serratia)、クロモバクテリウム属 (Chromobacterium)、スタフィロコッカス属 (Staphylococcus) 微生物由来のリパーゼのいずれかからな

る請求項 1 ないし 4 のいずれかの選択的にドコサヘキサエン酸が濃縮された高度不飽和脂肪酸含有油脂を製造する方法。

6. 上記モノグリセライドリバーゼおよび／またはジグリセライドリバーゼの 1 種以上およびそれ以外のリバーゼ 1 種以上を含む 2 種以上の
5 リバーゼが、ペニシリウム属およびキャンディダ属、またはペニシリウム属およびムコール属、またはペニシリウム属およびリゾープス属微生物由来である請求項 2 ないし 5 のいずれかの選択的にドコサヘキサエン酸が濃縮された高度不飽和脂肪酸含有油脂を製造する方法。

10

15

20

25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/03949

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁶ C12P7/64

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁶ C12P7/64

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAS (STN), REGISTRY (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP, 7-51075, A (NOF Corp.), February 28, 1995 (28. 02. 95), Comparative Example 5 (Family: none)	1 - 6
A	JP, 8-214892, A (Osaka Municipal Government), August 27, 1996 (27. 08. 96) (Family: none)	1 - 6
A	JP, 2-295490, A (NOF Corp.), December 6, 1990 (06. 12. 90) (Family: none)	1 - 6
A	JP, 2-295489, A (NOF Corp.), December 6, 1990 (06. 12. 90)	1 - 6

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

- Special categories of cited documents:
- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search December 12, 1997 (12. 12. 97)	Date of mailing of the international search report December 24, 1997 (24. 12. 97)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP97/03949

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl' C12P7/64

B. 調査を行った分野
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl' C12P7/64

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
CAS (STN), REGISTRY (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP, 7-51075, A (日本油脂株式会社) 28. 2月. 1995 (28. 02. 95), 比較例5 (ファミリーなし)	1-6
A	JP, 8-214892, A (大阪市) 27. 8月. 1996 (27. 08. 96) (ファミリーなし)	1-6
A	JP, 2-295490, A (日本油脂株式会社) 6. 12月. 1990 (06. 12. 90) (ファミリーなし)	1-6
A	JP, 2-295489, A (日本油脂株式会社) 6. 12月. 1990 (06. 12. 90)	1-6

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

12. 12. 97

国際調査報告の発送日

24. 12. 97

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号100
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)
村上 駒見高



4 B

8827

電話番号 03-3581-1101 内線 3448